

(15)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 456 153 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91107308.8

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 37/02, A61K 37/24,  
A61K 9/00, A61K 9/08,  
A61K 47/02**

(22) Anmeldetag: 06.05.91

(30) Priorität: 08.05.90 DE 4014654

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
13.11.91 Patentblatt 91/46

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
W-3550 Marburg 1(DE)**

(72) Erfinder: **Brazel, Dieter, Dr.  
Pfarracker 8  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Siebold, Bernhard, Dr.  
Spiegelslustweg 24a  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Krumwieg, Dorothee, Dr.  
Auf'm Gebrande 11  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Brune, Thomas, Dr.  
Ernst-Lemmer-Strasse 93  
W-3550 Marburg(DE)**

(74) Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al  
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung  
Postfach 80 03 20  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

(54) **Galenische wässrige Formulierungen von Erythropoietin und Ihre Verwendung.**

(57) Beschrieben sind galenische wässrige Formulierungen von Proteinen mit Erythropoietin-Wirkung, insbesondere von humanem nativem und von rekombinantem humanem Erythropoietin (EPO). Hochgereinigtes EPO ohne Fremdproteine oder andere übliche Stabilisatoren behält in einem physiologisch verträglichen wässrigen Phosphatpuffer, der ein physiologisch verträgliches Alkalimetallhalogenid aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält, und einen pH-Wert von 6 bis 8 aufweist, bei Raumtemperatur für mindestens 1 Jahr mindestens etwa 78 % seiner ursprünglichen Aktivität. In dieser galenischen wässrigen Formulierung sind die Präparate insbesondere zur subkutanen oder intramuskulären Verabreichung geeignet.

**EP 0 456 153 A1**



Die Erfindung betrifft galenische wäßrige Formulierungen von gereinigtem Erythropoietin, insbesondere von humanem nativem und von rekombinantem humanem Erythropoietin (rh EPO). Die Formulierungen der Erfindung - ohne Fremdproteine, Zucker, Aminosäuren oder andere übliche Stabilisierungsmittel - behalten bei einer Temperatur von 4-8 °C für mindestens 1 Jahr mindestens etwa 78 % ihrer ursprünglichen Aktivität.

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein mit 166 Aminosäuren, 3 Glykosylierungsstellen an den Aminosäure-Positionen 24, 38 und 83 und einem Molekulargewicht von etwa 34 000. EPO läßt sich entweder aus natürlichen Quellen, wie menschlichem Urin isolieren (vgl. z.B. Miyake et al., J. Biol. Chem., Bd. 252 (1977), 5558-5564) oder es kann durch gentechnologische Verfahren hergestellt werden (vgl. z.B. EP-A 0148 605 und 0 267 678). Wäßrige Lösungen von Erythropoietin sind bei Temperaturen von etwa 3 °C bis Raumtemperatur instabil.

Patienten mit Niereninsuffizienz können kein EPO bilden und leiden daher an einer Anämie. Versuche, diese EPO-Unterversorgung durch Verabfolgung von EPO zu kompensieren und die Symptome der Anämie zu verringern, sind bereits erfolgreich gewesen. Weitere klinische Anwendungen bestehen in der Verabreichung von hEPO bei iatrogenen Anämien nach Chemotherapie oder Strahlentherapie maligner Erkrankungen.

Eine Einzeldosis von EPO beträgt nur wenige Mikrogramme. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit nach i.v.- Verabreichung können physiologische Plasma-Spiegel am besten durch subkutane Injektion erreicht werden.

Die bisher vorgeschlagenen oder verfügbaren galenischen Formulierungen von Erythropoietin enthalten Detergens-, und/oder Protein-, Zucker- bzw. Polyalkoholzusätze, die einerseits EPO stabilisieren und andererseits die Adsorption des EPO an die Innenwand des Aufbewahrungsbehälters (d.h. der Ampulle) verhindern sollen (EP-B-0 178 576; EP-A-0 178 665; G. Krystal et al., Blood Bd.67 (1986), 1, 71 - 79). Subkutane oder i.m. Applikation von solchermaßen stabilisiertem EPO führt zu lokalen Entzündungen unter Bildung von Granulomen. Nach bekannten Verfahren hergestelltes hochreines EPO (EP-A-0 236 059; US-A 4,667,159, PCT/US 86/01342 (= WO 86/07594)) verlor innerhalb einer Woche mehr als 25 % seiner Aktivität bei Lagerung bei 24 °C. Aus der EP-B-0 178 576 ist ferner eine Lösung von humanem Erythropoietin, das mit <sup>14</sup>C-Formaldehyd reaktiv methyliert wurde, in PBS bekannt; vgl. Experiment 1 und 2.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, galenische wäßrigen Formulierungen von gereinigtem Erythropoietin bereitzustellen, die frei von den üblichen stabilisierenden Zusätzen sind und trotzdem eine ausreichende Stabilität bei Temperaturen von etwa 3 °C bis Raumtemperatur aufweisen, und sich insbesondere zur subkutanen bzw. intramuskulären Applikation eignen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß gereinigtes Erythropoietin (etwa 99%-ig rein), insbesondere gereinigtes natives oder rekombinantes humanes Erythropoietin, in einem physiologisch verträglichen wäßrigen Phosphatpuffer vom pH-Wert 6 bis 8, der ein physiologisch verträgliches Alkalimetallhalogenid, aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält, in versiegelten Reagenzgläsern oder Glasampullen über lange Zeit bei Temperaturen von 4 bis 8 °C stabil ist.

Die Erfindung betrifft somit galenische wäßrige Formulierungen von gereinigtem Erythropoietin in einem physiologisch verträglichen wäßrigen Phosphatpuffer vom pH-Wert 6 bis 8, der ein physiologisch verträgliches Alkalimetallhalogenid, aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält. Besonders bevorzugt ist ein Puffer aus 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7,8. Die Konzentration des Erythropoietins in der wäßrigen Pufferlösung beträgt 50 - 1000 µg pro ml Pufferlösung.

Beispiele für physiologisch verträgliche wäßrige Phosphatpuffer sind Natriumphosphatpuffer und Kaliumphosphatpuffer, vorzugsweise Natriumphosphatpuffer. Beispiele für physiologisch verträgliche Alkalimetallhalogenide sind Natriumchlorid und Kaliumchlorid, vorzugsweise Natriumchlorid. Ein bevorzugter Phosphatpuffer ist ein Puffer mit 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7,8. Dieser Puffer wird abgekürzt auch als PBS bezeichnet. Die wäßrigen Lösungen des Erythropoietins in PBS sind sehr gut zur subkutanen oder intramuskulären Applikation geeignet.

Die Erfindung betrifft zusätzlich die Verwendung der galenischen wäßrigen Formulierungen zur Herstellung von Injektionspräparaten zur subkutanen oder intramuskulären Applikation. Besonders bevorzugt ist die subkutane Verabreichung, weil sie gegenüber den bekannten Formulierungen, die mit Proteinen stabilisiert sind, keine Reizungen und entzündlichen Schmerzen verursacht. Dies haben klinische Versuche ergeben.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

#### Reinigung von rh EPO

Die Reinigung von rh EPO erfolgte ausgehend von serumhaltigem oder serumfreiem Medium, das



durch rh EPO produzierende animale Zellen konditioniert war, nach dem in der EP-A 0 267 678, Seite 6, Zeile 45, bis Seite 9, Zeile 5. beschriebenen Verfahren. Das Verfahren umfaßt

- (1) die Klärung, das Konzentrieren und die Dialyse des Kulturmediums,
- (2) die Ionenaustauschchromatographie,
- (3) die präparative "reverse phase HPLC" und
- (4) die Gelfiltrationschromatographie.

Zur Gelfiltrationschromatographie wurde die Säule mit PBS, d.h. 50 mM Natriumphosphatpuffer, 100 mM NaCl, pH 7,8 äquilibriert. Mit dieser Pufferlösung wurde rh EPO in einem einzigen symmetrischen Peak eluiert (Messung des Eluats bei 280 nm). Das erhaltene rh EPO war mindestens 99%-ig rein gemäß SDS-PAGE.

(5) Verdünnung

Die vereinigten rh EPO-Fractionen des Gelfiltrationsschritts (4) hatten einen Gehalt von 0,1 - 0,8 mg EPO pro ml und wurden mit dem Natriumphosphat-Natriumchloridpuffer (PBS) pH 7,8 in Einzeldosen zu 100 µg/ml abgefüllt.

## Beispiel 2

### Prüfung der Stabilität

Die Stabilität der gemäß Beispiel 1 erhaltenen PBS-Lösung von rh EPO wurde nach Lagerung der Einzeldosen in sterilen Glasröhrchen im Vergleich mit verschiedenen Stabilisatoren geprüft. Die Aktivität des rh EPO wurde durch <sup>3</sup>T-Einbau in mit Phenylhydrazin behandelten Milzzellen der Maus in üblicher Weise gemessen. Die nachfolgend in der Tabelle dargestellten Daten sind bezogen auf die Ausgangsaktivität des eingesetzten rh EPO = 100 %.

#### (a) Lagerung bei 4 - 8°C

Stabilisator	Menge an Stabilisator (Gew./Gew. relativ zu EPO) bezogen auf 100 µg EPO/ml PBS	% Aktivität nach 12 Monaten
--------------	---	--------------------------------

PBS allein	-	78,5
PBS + Sorbit	5000	51
PBS + Glycerin	6150	0
PBS + Haemaccel <sup>R</sup>	100	68

#### (b) Lagerung bei 37°C (beschleunigter Test)

Stabilisator	Menge an Stabilisa- tor	% Aktivität nach Monaten			
		1	2	3	6

PBS allein	-	86,3	39	11,2	9,9
PBS + Sorbit	5000	33,5	10,7	5,1	0
PBS + Haemaccel <sup>R</sup>	100	42	14,8	6,0	5,1

Anm.: Haemaccel<sup>R</sup> ist eine abgebaute Gelatine

Aus den Tabellen ist die überraschend bessere Stabilisierung von rh EPO in PBS (pH 7,8) ohne weiteren Zusatz eines Stabilisators ersichtlich.



**Patentansprüche**

1. Galenische wäßrige Formulierungen von gereinigtem Erythropoietin in einer physiologisch verträglichen wäßrigen Pufferlösung vom pH-Wert 6 bis 8, die ein physiologisch verträgliches Alkalimetallphosphat und Alkalimetallhalogenid, aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält.
2. Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Pufferlösung aus 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7,8, besteht.
3. Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Erythropoietin humanes natives oder rekombinantes Erythropoietin ist.
4. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Erythropoietins 50 - 1000 µg pro ml Pufferlösung beträgt.
5. Verwendung einer wäßrigen Formulierung von gereinigtem Erythropoietin gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung von Injektionspräparaten.
6. Verfahren zur Herstellung einer stabilen galenischen Formulierung von Erythropoietin nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Erythropoietin einer Reinheit von  $\geq 99\%$  in einer physiologisch verträglichen wäßrigen Pufferlösung vom pH-wert 6 bis 8 gelöst wird, wobei besagte Pufferlösung ein physiologisch verträgliches Alkalimetallphosphat und Alkalimetallhalogenid, aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält.

**Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR**

1. Verfahren zur Herstellung einer stabilen galenischen Formulierung von Erythropoietin (EPO), dadurch gekennzeichnet, daß EPO einer Reinheit von  $\geq 99\%$  in einer physiologisch verträglichen wäßrigen Pufferlösung vom pH - Wert 6 bis 8 gelöst wird, wobei besagte Pufferlösung ein physiologisch verträgliches Alkalimetallphosphat und Alkalimetallhalogenid, aber sonst keine stabilisierenden Zusätze enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Pufferlösung aus 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7.8 besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das EPO humanes natives oder rekombinantes EPO ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des EPO 50 - 1000 µg pro ml Pufferlösung beträgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die galenische Formulierung zur Injektion vorbereitet ist.





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 10 7308

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
D,X	EP-A-0 178 665 (CHUGAI SEIYAKU) * Ansprüche 1,5,8,12; Seite 2, Zeilen 6-7,25-27,32-37; Seite 3, Zeilen 3,14-16; Seite 7, Beispiel 8 * - - -	1,3,5-6	A 61 K 37/02 A 61 K 37/24 A 61 K 9/00 A 61 K 9/08 A 61 K 47/02
A	EP-A-0 178 576 (CHUGAI SEIYAKU) * Ansprüche; Seite 4, Zeilen 35-38; Seite 5, Zeilen 7-11,19-20; Seite 8, Beispiel 4 * - - -	1-6	
A	EP-A-0 306 824 (BOEHRINGER) * Ansprüche 1,5-10; Seite 4, Beispiel 1 * - - - - -	1-6	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)  A 61 K
Recherchenort  Den Haag		Abschlußdatum der Recherche  11 Juli 91	Prüfer  SCARPONI U.
<div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</div> <div>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div> <div>E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument ----- &amp;: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div>			